

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПУЛЬС-ЭЛЕКТРОРЕЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК ПРИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ У РАСТЕНИЙ**В.П. Егорова, Е.В. Манкевич, А.В. Шкрабков, А.С. Горбач****ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время установлено, что под воздействием стрессоров различного происхождения в клетках растений индуцируется генетически детерминированный механизм программируемой клеточной смерти (ПКС) [1]. Этот процесс играет существенную роль в реализации программы индивидуального развития многоклеточных организмов и ответной реакции на стрессорное воздействие [2].

Показано, что основным проявлением ПКС на биохимическом уровне, как у животных, так и у растений, является двухэтапная деградацией ДНК хроматина под действием эндонуклеаз.

На первом этапе деградации ядерной ДНК при ПКС, атаке индуцированных эндонуклеаз подвергается ДНК хроматина в области относительно протяжённых розеточных петель. На этом этапе деградации хроматина с помощью гель-электрофореза регистрируют фрагменты ДНК длиной 50, 300 и 800 Кб (тысяч пар оснований). На следующем этапе, под действием эндонуклеаз, происходит деградация ДНК петель на фрагменты, кратные по длине нуклеосомной ДНК (180-200 Кб). При электрофоретическом разделении таких фрагментов регистрируется один из характерных признаков ПКС - так называемая "нуклеосомная лесенка" [3].

Установлено, что для исследования коротких (до 20 Кб) и длинных (от 10 Кб) фрагментов ДНК необходимо использовать различные типы гель-электрофореза [4].

Метод гель-электрофореза в постоянном электрическом поле используют для разделения молекул ДНК с молекулярной массой от нескольких десятков до 20 Кб. Однако этот простой и широко применяемый метод для определения межнуклеосомной фрагментации ДНК с образованием лестницы фрагментов в агарозном геле, кратных 180-200 парам нуклеотидов, имеет ряд недостатков. К недостаткам этого метода можно отнести, прежде всего, его неспособность разделить длинные фрагменты ДНК, т.е. он позволяет регистрировать только конечный этап деградации ядерной ДНК.

Для исследования процесса деградации ДНК при ПКС у растений, вызванных воздействием умеренных стрессовых факторов, необходимо использовать такие условия проведения гель-электрофореза, которые позволили бы регистрировать весь или почти весь диапазон образующихся фрагментов.

Для проведения подобного рода исследований используют метод гель-электрофореза в пульсирующем электрическом поле (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE, русск. пульс-электрофорез). В настоящее время существует несколько разновидностей этого метода: FIGE - гель-электрофорез в инвертирующем поле (Field Inversion Gel Electrophoresis), TAFE - электрофорез в поперечно-переменном поле (Transverse Alternating-Field Electrophoresis), RGE - электрофорез с вращающимся гелем (Rotating Gel Electrophoresis) и CHEF - электрофорез в контролируемом гомогенном электрическом поле (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) [4].

Необходимо отметить, что к преимуществам гель-электрофореза в инвертирующем поле можно отнести простоту аппаратной базы (подходят любые камеры для простого электрофореза) и то, что подвижность молекул ДНК не зависит от их местоположения в геле [5].

В связи с этим, в данной работе метод гель-электрофореза в инвертирующем электрическом поле был использован для исследования ядерной ДНК корней ячменя при умеренном солевом стрессе в присутствии эписибрасинолида.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили корни 7-дневных проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Сталь», который был получен в «РУП НПЦ НАН Беларуси по земледелию» в 2008 году.

Проращивание семян вели на водопроводной воде в термостатах в темноте при 22°C в течение 48 ч (ГОСТ 12038-84). Проросшими считали наклюнувшиеся семена с зародышевым корешком около 1 мм. На третьи сутки семена с проклюнувшимся зародышевым корешком и колеоптилем высаживали в вегетационные сосуды и подвергали солевому стрессу. Для этого проростки выращивали 5 суток в растворе хлорида натрия с концентрацией от 100 мМ до 200 мМ с шагом 50 мМ. В качестве контроля служили проростки, выращенные в течение того же времени на водопроводной воде без хлорида натрия.

Оценку степени повреждения ДНК проводили в кончиках корней проростков длиной 10-15 мм, у которых был удален корневой чехлик, методом гель-электрофореза в инвертирующем электрическом поле. Растительный материал, предназначенный для анализа, тщательно перетерли в жидком азоте и к полученному тонкому порошку добавляли лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 7.0; 200 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl). К гомогенату добавляли равный объём 1,4 % агарозы с низкой температурой плавления (50°C). Из полученной смеси формировали агарозные блоки при 4°C, которые затем помещали в инкубирующий буфер (1 М Tris-HCl, pH 8.0; 0,5 М ЭДТА, pH 9,2; 1% саркозилат Na; 1 мг/мл протеиназа К) и инкубировали 16 часов при 55°C с двойной заменой буфера. Электрофорез образцов ДНК проводили в 1% агарозном геле в 0,5 x TBE буфере (pH 8,0) в инвертирующем электрическом поле при температуре 10-12°C. Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 15 мин, затем отмывали в TE буфере (10 мМ Tris-HCl; 1 тМ ЭДТА, pH 8,0). Гель-документацию вели с помощью прибора MagicQuant 300.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в литературе широко представлены данные, которые показывают, что ранние стадии ПКС у растений при стрессорном воздействии ассоциируются с появлением протяжённых фрагментов ДНК, длина которых изменяется в пределах от 50 до 1100 кД[1].

Для исследования процесса деградации ДНК при ПКС растений, вызванных воздействием стрессовых факторов, и влияния на эти процессы brassinosterоидов необходимо было подобрать условия гель-электрофореза, которые позволяли регистрировать весь или почти весь диапазон образующихся фрагментов.

Необходимый режим исследований был подобран при использовании гель-электрофореза в инвертирующем асимметричном электрическом поле [5], которое формировалось при помощи специального устройства (оригинальная разработка Института биорганической химии НАН, республики Беларусь).

Данное устройство представляет собой приставку к прибору для гель-электрофореза, которая формирует инвертирующее электрическое поле (угол переориентации 180°) с целью увеличения разрешающей способности метода до степени, необходимой при работе с ядерной ДНК растительных объектов.

Для дальнейших исследований был проведен подбор параметров (время пульса, напряжённость поля, длительность фореза) для обеспечения наиболее оптимального электрофоретического разрешения фрагментов ядерной ДНК.

Показано, что оптимальными условиями гель-электрофореза для разделения фрагментов ДНК длиной 50-300 кД и 800-1100 кД были следующие: время пульса - 60 сек, напряжение - 175 В, время проведения фореза - 12 ч (рис. 1А и 1Б).

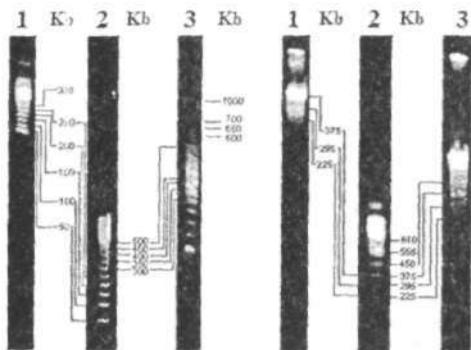


Рисунок 1. Электрофореграммы ДНК маркеров, полученные методом пульсирующего электрофореза в 0,5 x TBE буфере, при температуре 10-12°C:

(А) Lambda ladders 50-1000 kb (Promega): 1-6 часов с временем пульса 20 сек и напряжением 175 В; 2 - 12 часов с временем пульса 60 сек и напряжением 175 В; 3 - 12 часов с временем пульса 20 сек и напряжением 175 В.

(Б) Pulse marker 225-2200 kb (Sigma): 1 - 6 часов с временем пульса 20 сек напряжением 175 В; 2 - 12 часов с временем пульса 60 сек напряжением 175 В; 3 - 12 часов с временем пульса 60 сек напряжением 175 В.

В результате проведенных исследований были выбраны условия проведения гелеэлектрофореза, позволяющие с высокой точностью определить молекулярную массу образующихся фрагментов ДНК в зависимости от интенсивности и длительности воздействия стрессора, и тем самым установить уровень повреждения генома растительных клеток.

На основе полученных результатов были проведены исследования особенностей деградации ДНК корней 7-дневных проростков ячменя, под влиянием эпибрасинолида в условиях умеренного солевого стресса.

Анализ электрофореграммы показал, что при воздействии умеренного солевого стресса в диапазоне концентраций хлорида натрия от 100 мМ до 200 мМ на корни 7-дневные проростков ячменя наблюдается деградация ядерной ДНК, которая идентифицируется появлением фрагментов длиной около 50-300, 800 и 1100 кД (рис. 2). Появление данных фрагментов ассоциируется с начальными стадиями ПКС, индуцированной умеренным солевым стрессом [6,7].

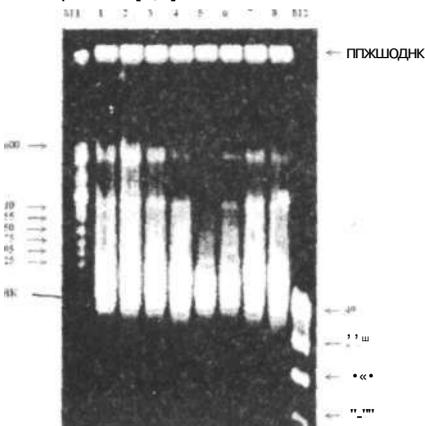


Рисунок 2. Электрофореграмма ядерной ДНК корней ячменя сорта «Сталь» в присутствии эпибрасинолида при умеренном солевым стрессе (12 часов с временем пульса 60 сек и напряжением 175 В, температура 10-12°C):

M1 - маркер Pulse marker 225-2200 Kb (Sigma); 7 - корни проростков, выращенных на воде (контроль 1); 2 - корни проростков, выращенных на растворе хлорида натрия с концентрацией 100 мМ; 3 - корни проростков, выращенных на растворе хлорида натрия с концентрацией 150 мМ; 4 - корни проростков, выращенных на растворе хлорида натрия с концентрацией 200 мМ; 5 - корни проростков, выращенных на воде с добавлением ЭБ 10⁻⁹ М (контроль 2); 6 - корни проростков, выращенных на растворе хлорида натрия, концентрация 100 мМ, с добавлением ЭБ 10⁻⁸ М; 7 - корни проростков, выращенных на растворе хлористого натрия, концентрация 150 мМ, с добавлением ЭБ 10⁻⁹ М; 8 - корни проростков, выращенных на растворе хлорида натрия, концентрация 200 мМ, с добавлением ЭБ 10⁻⁸ М; M2 - маркер λ -ladder III

Необходимо также отметить наличие четкой корреляционной зависимости между увеличением концентрации хлорида натрия и степенью дезинтеграционных процессов генома корневых проростков.

Сравнительный анализ электрофореграммы ядерной ДНК корней 7-дневных проростков, выращенных из семян, которые были предварительно обработаны 10⁻⁹ М раствором ЭБ, с контрольным вариантом (ДНК из корней 7-дневных проростков, выращенных из семян без предварительной обработки ЭБ) выявил значительное уменьшение количества фрагментов ДНК с длиной от 50 до 300 кД (рис. 2). Полученные результаты, возможно, свидетельствуют о включении репаративных механизмов поврежденной ДНК, при опосредованном действии эпибрасинолида [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ПКС рассматривают как механизм реализации адаптивной реакции растений, которая обеспечивает их устойчивость к факторам внешней среды биотической и абиотической природы. Одним из основных маркеров индукции ПКС у растений при стрессорном воздействии является доменная и межнуклеосомная деградация ДНК. Методом гелеэлектрофореза в инвертирующем электрическом поле показано, что при воздействии умеренного солевого стресса на корни проростков ячменя наблюдается деградация ядерной ДНК, которая идентифицируется появлением фрагментов 50-300, 800 и 1100 Кб. Появление подобных фрагментов свидетельствует о начальной стадии ПКС, индуцированной воздействием солевого стресса. Продемонстрирована обратимость начальных стадий деградации ядерной ДНК в корнях 7-дневных проростков ячменя в присутствии эпибрасинолида при умеренном солевым стрессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pennell, R.I., Lamb, C. // Plant Cell. 1997. -V. 9. N7. P. 1157-1168.
2. Greenberg J.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. N22. P. 12094-12097
3. Obemammer F. // EMBO J. 1993. V. 12 N4. P. 3679-3684.
4. Насонова Е.С. // Цитология. 2008. Т. 50. №11. С. 927-935
5. Carte G. F., Frank M., Olson M. V. // Science. 1986. V. 232. N4746. P. 65-68
6. Koukalova B., Kovarik A, Fajkus J et al. // FEBS Lett. 1997. V. 414. N2. P. 289-292.
7. Mittler R., Simon L, Lam El J. Cell Sci. 1997. V. 110. N11. P. 1333-1344.
8. Khripach V., Zhabinskii V., De Groat A. // Ann. Botany. 2000. V. 86. N3. P. 441-447.

УДК535.8:544.77:666.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПРИ СТАРЕНИИ СЕМЯДОЛЕЙ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ПРОРОСТКОВ СОИ (GLYCINE MAX L.)

В.П. Егорова, А.В. Шкрабков, А.С. Горбач

ВВЕДЕНИЕ

Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют об общности механизмов программируемой клеточной смерти (ПКС) у животных и растений [1]. Общеизвестно, что ПКС у растений служит для выполнения таких жизненно важных функций как реализация программы развития, дифференцировка клеток и тканей при эмбриогенезе и постэмбриональном развитии, защита от патогенов и неблагоприятных воздействий окружающей среды [2].

Картина ПКС у животных и растений имеет много общего. Как и у животных, в клетках растений наблюдается ряд характерных структурно-морфологических изменений: